

# IL-29 は口腔粘膜上皮細胞において RIG-I および IFI-16 発現誘導を介し抗ウイルス活性を増強する

四釜 洋介, 黒澤 実愛, 松下 健二

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター 口腔疾患研究部

## IL-29 exhibits antiviral activity by inducing RIG-I and IFI-16 expression in oral epithelial cells

Yosuke Shikama, Mie Kurosawa, Kenji Matsushita

Department of Oral Disease Research, National Center for Geriatrics and Gerontology

### Abstract

Interleukin (IL)-29 is a cytokine belonging to the type III interferon family, which regulates a similar set of genes as type I interferons. Although type I interferons act globally, type III interferons primarily target epithelial cells and protect them against the frequent viral attacks that are common for barrier tissues. The antiviral effects of IL-29 have been demonstrated at barrier surfaces in the respiratory and gastrointestinal tracts, liver, blood-brain barrier, and skin, but it remains unknown whether IL-29 exhibits these effects in oral epithelial cells. In this study, we found that the functional IL-29 receptor, interferon-λ receptor 1, is expressed in epithelial cells from both human oral mucosa and gingiva, but not in human gingival fibroblasts. Although IL-29 stimulation did not induce pro-inflammatory cytokine mRNA expression, such as IL-6 and IL-8, it did induce retinoic acid-inducible gene (RIG)-I and interferon gamma-inducible protein 16 (IFI-16) production via a signal transducers and activator of transcription 1 (STAT1)-dependent pathway in gingival epithelial cells. RIG-I and IFI-16 sense viral nucleic acids, and the stimulation of these receptors induces interferon beta production. Moreover, we confirmed that the augmenting effects of IL-29 on 5'triphosphate double-stranded RNA (a synthetic ligand for RIG-I)-induced interferon beta production in gingival epithelial cells. These data suggest the therapeutic potential of IL-29 for preventing viral infections in the oral mucosa.

Endotoxin and Innate Immunity 22 : 40~42, 2019

**Key words :** Type III interferon, Type I interferon, Virus infection, Innate immunity, Oral mucosa

### はじめに

口腔病変の主体は粘膜病変であり、その原因は多彩であるが、感染症、とくにウイルス感染による場合も多い。ウイルス感染による口腔咽頭の粘膜病変は、水疱、アフタ、びらん、潰瘍を呈し、白板症や口腔の扁平上皮癌もウイルス感染が原因であることが明らかになっている。これまで抗ウイルス療法として I 型インターフェロン (IFN) が用いられてきたが、I 型 IFN 受容体は標的臓器および標的細胞以外のあらゆる細胞で発現しているため、種々の副作用が報告されてきた。これに対し、III 型 IFN である interleukin (IL)-29 (IFN-λ1) は I 型 IFN 同様、抗ウイルス作用を有するが、その受容体発現が限局的であるため、副作用の少ない IFN として期待されて

いる。III 型 IFN に関する研究は、肝臓、腸管上皮、気道粘膜上皮、皮膚、血液、血液脳関門などで行われている<sup>1)</sup>が、口腔粘膜における IL-29 受容体発現やその機能に関する報告はほとんどない。われわれは IL-29 の口腔粘膜における抗ウイルス薬としての臨床応用を目指し日々研究している。本稿では、口腔粘膜病変の原因となるウイルスおよび III 型 IFN について概説した後、われわれの研究結果を交えてその臨床応用の可能性について述べる。

### 1. ウイルス性口腔粘膜疾患

#### 1-1. 単純ウイルス属およびパリスロウイルス属<sup>2)</sup>

2 本鎖 DNA をゲノムとして持つ DNA ウイルスであり、単純ヘルペス (HSV) および水痘帯状疱疹ウイルス (VZV) が知られている。HSV は接触感染と考えられて

おり、不顕性感染も多いことが知られているが、VZV は感染力が高く、不顕性感染は少ないと考えられている。ヘルペスウイルス属の特徴は、組織中に潜伏感染することである。とくに HSV および VZV は神経節に潜伏感染し、回帰感染として知られている。宿主の免疫力低下などにより再活性化し症状を呈する。

### 1-2. エンテロウイルス属<sup>3)</sup>

エンベロープのない一本鎖 RNA ウイルスであり、手足口病の主な原因ウイルスとなるエンテロウイルス 71 やコクサッキーウイルス A16 が属する。感染経路についてはまだ不明な点もあるが、感染すると症状として口腔粘膜に疼痛性の水疱、潰瘍が形成される。また、夏かぜの代表疾患としても知られているヘルパンギーナの原因ウイルスは主にコクサッキーウイルス A4 である場合が多く、水疱および潰瘍を形成する。

### 1-3. モルビリウイルス属<sup>4)</sup>

エンベロープを持つ一本鎖 RNA ウイルスであり、麻疹ウイルスがこれに属する。飛沫感染や接触感染などさまざまな感染経路を示し、その感染力は極めて強い。ウイルス感染後 10~12 日の潜伏期後、発熱や上気道炎症状を経て発疹を認めるが、その 1~2 日前頃に臼歯部頬粘膜に白色小斑点（コプリック斑）が出現する。

### 1-4. パピローマウイルス属<sup>5)</sup>

エンベロープのない 2 本鎖 DNA ウイルスであり、ヒトパピローマウイルス（HPV）感染による病変は、口腔・消化器ばかりでなく、婦人科、皮膚科、耳鼻科、泌尿器科領域と多岐にわたる。HPV は上皮細胞、とくに盛んに細胞増殖している基底細胞に感染すると考えられている。口腔粘膜においては、白板症、紅板症、乳頭腫などの良性病変の発症に、また悪性病変である扁平上皮癌の発症に HPV の関与が報告されている。

### 1-5. レンチウイルス属<sup>6)</sup>

エンベロープを持つ一本鎖 RNA ウイルスであり、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）がこれに属する。HIV 感染に伴う口腔病変として再発を伴う口腔カンジダ、口角炎、口内炎などが知られている。口腔病変が後天性免疫不全症候群（AIDS）診断のきっかけになることも多く、臨床では HIV 検査の敷居を下げて診療にあたるのが重要であると考えられる。

## 2. III 型 IFN

III 型 IFN は IFN- $\lambda$  ファミリーとしても知られている比較的新しい IFN であり、IFN- $\lambda 1$  から  $\lambda 4$  まで存在する。 $\lambda 1$ ,  $\lambda 2$ ,  $\lambda 3$  はそれぞれ IFNL1 (IL-29), IFNL2 (IL-28A), IFNL3 (IL-28B) によりコードされ、抗ウイルス

効果は IFN- $\lambda 1 > \text{IFN-}\lambda 3 > \text{IFN-}\lambda 2$  の順に強いことが報告されている<sup>7)</sup>。IFN- $\lambda 4$  は他の IFN- $\lambda$  との相同性が低く、機能も異なる<sup>8)</sup>。あらゆる細胞に受容体が発現している I 型 IFN (IFN- $\alpha$  および IFN- $\beta$ ) とは異なり、IFN- $\lambda$  受容体、とくにそのリガンドと高親和性である IFN- $\lambda$  R1 はその発現が肝細胞、上皮細胞、および樹状細胞などに限局している。IFN- $\lambda$  が受容体に結合すると、Signal Transducers and Activator of Transcription (STAT) 1 および STAT2 をリン酸化し、Interferon Stimulating Gene (ISG) を誘導して抗ウイルス作用を発揮する<sup>1)</sup>。つまり、III 型 IFN は受容体と結合後は I 型 IFN と同じ下流シグナル分子を共有している。ISG 誘導能は I 型 IFN と比較し、III 型 IFN の方が弱いことが知られている<sup>7)</sup>が、III 型 IFN シグナルは持続的に ISG を誘導するとされている。

## 3. 口腔粘膜における IL-29 受容体 (IFN- $\lambda$ R1) 発現およびその機能解析

上記背景をふまえ、われわれは口腔粘膜を構成する細胞および IL-29 受容体が発現していることが知られている表皮由来ケラチノサイトを用い、その遺伝子発現レベルを PCR 法で解析した。その結果、表皮由来ケラチノサイトと同様に、口腔粘膜由来および歯肉由来ケラチノサイトにおいても IFN- $\lambda$ R1 が遺伝子レベルで発現していることを確認した。さらにフローサイトメトリー法を用いタンパクレベルで IFN- $\lambda$ R1 が発現していることも明らかにした。一方で、歯肉由来線維芽細胞では発現していなかったため、口腔粘膜において上皮細胞のみにその受容体が発現している可能性が推察される。次に口腔粘膜由来および歯肉由来ケラチノサイトを IL-29 で刺激すると、その濃度依存的に STAT1 がリン酸化されることをウェスタンブロットング法で確認した。宿主細胞が細菌やウイルスなどの病原体を感知する認識機構として、病原体で保存された特徴的な構造を認識するパターン認識受容体を発現している。上記 1. で記述した通り、口腔粘膜疾患の原因になるウイルスは RNA ウイルスおよび DNA ウイルスともに存在するため、本研究では RNA ウイルスの核酸認識を担うパターン認識受容体である retinoic acid-inducible gene (RIG)-I および 2 本鎖 DNA ウイルスの核酸認識を担うパターン認識受容体である interferon gamma-inducible protein 16 (IFI-16)<sup>9)</sup> に着目し解析を行った。その結果、ヒト歯肉由来ケラチノサイトにおいて、IL-29 濃度依存的に RIG-I および IFI-16 発現が誘導されることをウェスタンブロットング法で確認した。IL-29 で発現誘導されるこれら 2 つの受容体は、STAT1 阻害薬によりその発現が著しく抑制されたため、STAT1 依存的反応と考えられる。以上の様に、IL-29 は炎症サイトカインなどを誘導することなく、ウイルス核酸を認識する受容体を発現誘導することが明らかになったため、われわれは IL-29 が口腔粘膜

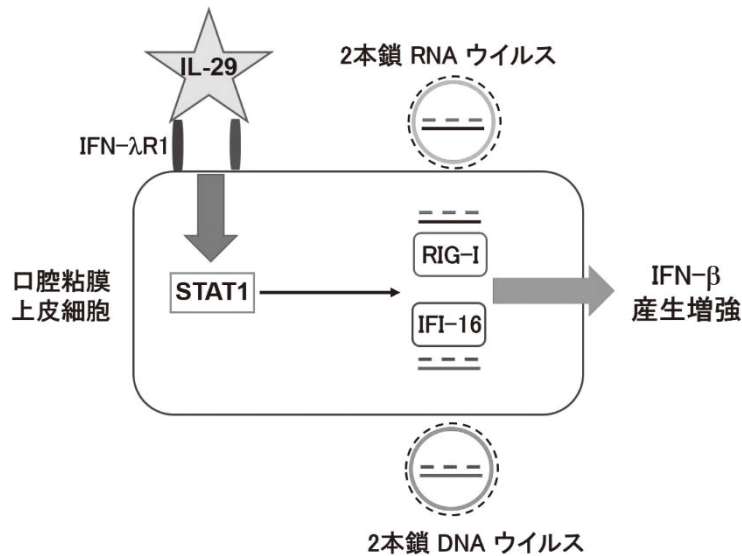


図 1 口腔粘膜における IL-29 の抗ウイルス能増強メカニズム

において、抗ウイルス能を増強し得るか検証した。すなわち、ヒト歯肉由来ケラチノサイトにおいて、RIG-Iの合成リガンドである 5' triphosphate double-stranded RNA 刺激による IFN- $\beta$  産生が IL-29 前処理により増強されるか検討したところ、real-time PCR 法および ELISA 法を用いた結果から、その増強効果を確認した(図 1)。今後、生ウイルスを使用した実験も検討しており、臨床応用に向けた更なるエビデンス構築が必要と考えられる。

### おわりに

ウイルスに関する研究は非常に幅広く行われているが、口腔粘膜における抗ウイルス能の増強、賦活作用に着目した検討はほとんど行われていない。歯科領域疾患の中で、ウイルス感染に起因する疾患の予防、治療法開発は临床上非常に重要であると考えられる。われわれが得た知見を基にした新規治療戦略を構築することを現在目指している。

### 文 献

- 1) Lazear HM, Nice TJ, Diamond MS : Interferon-lambda : Immune Functions at Barrier Surfaces and Beyond. *Immunity* 43 : 15-28, 2015
- 2) 川口寧 : ヘルペスウイルスの感染機構. *生化学* 84 : 343-351, 2012
- 3) Muehlenbachs A, Bhatnagar J, Zaki SR : Tissue tropism, pathology and pathogenesis of enterovirus infection. *J Pathol* 235 : 217-228, 2015
- 4) 国立感染症研究所 : 麻疹とは. <https://www.niid.go.jp/niid/ja/kansenohanashi/518-measles.html>
- 5) 前田初彦 : ヒトパピローマウイルス (HPV) と口腔粘膜疾患. *日口腔外会誌* 56 : 464-470, 2010
- 6) 田上正 : AIDS の口腔粘膜病変. *病理と臨* 26 : 603-609, 2008
- 7) Friberg J, Levine S, Chen C, et al. : Combinations of lambda interferon with direct-acting antiviral agents are highly efficient in suppressing hepatitis C virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 57 : 1312-1322, 2013
- 8) Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, et al. : A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus. *Nat Genet* 45 : 164-171, 2013
- 9) Zevini A, Olgarnier D, Hiscott J : Crosstalk between Cytoplasmic RIG-I and STING Sensing Pathways. *Trends Immunol* 38 : 194-205, 2017